

518 Rec'd PCT/PTO 26 AUG 1999

PCT #6
PATENT
0500

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of)
Edmond Daniel Roussel et al.)
Serial No. 09/331,554) Group:
Filed:)
Title: ABSORBABLE COMPOSITION CONTAINING) Examiner:
PROPIONIC BACTERIA CAPABLE OF RELEASING)
NITRIC OXIDE IN THE HUMAN OR ANIMAL)
ALIMENTARY CANAL)

RECEIVED
JAN 07 2000

CLAIM FOR PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

Applicant hereby claims the priority of French Patent Application Serial No. 96/15977, filed December 24, 1996 and French Patent Application Serial No. 97/00885, filed January 28, 1997, under the provisions of 35 U.S.C. 119.

Certified copies of the priority documents are enclosed herewith.

Respectfully submitted,

Anthony Niewyk
Registration No.: 24,871
Attorney for Applicant

AN:pmp

BAKER & DANIELS
111 EAST WAYNE STREET, SUITE 800
FORT WAYNE, IN 46802
TELEPHONE: 219-424-8000
FACSIMILE: 219-460-1700

Enc. Priority Documents (2)
Return Postcard

CERTIFICATE OF MAILING

I HEREBY CERTIFY THAT THIS CORRESPONDENCE
IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES POSTAL
SERVICE AS FIRST CLASS MAIL IN AN ENVELOPE
ADDRESSED TO: ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, DC 20231, ON: August 23, 1999.

ANTHONY NIEWYK, Registration No. 24,871
Name of Registered Representative

Signature

August 23, 1999

Date

8 Rec'd PCT/PTO 2 A 1999

RECEIVED
JAN 07 2000

RECEIVED
AUG 30 1999
PCT INITIAL PROCESSING



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

LE DOSSIER A FAIT L'OBJET D'UN RETRAIT.

Fait à Paris, le **22 JUIN 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis. rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

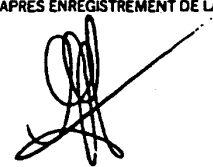
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 24 DEC 1996 96 15977 - DEPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 24 DEC. 1996		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET HERRBURGER 115 Boulevard haussmann 75008 PARIS n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone 92.1114 01 44 51 68 00	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° date		Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	
Titre de l'invention (200 caractères maximum) Composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités importantes de monoxyde d'azote dans l'intestin humain ou animal			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination Société dite : LABORATOIRES STANDA S.A		Forme juridique	
Nationalité (s) française Adresse (s) complète (s) 68, rue Robert Kaskoreff 14050 CAEN CEDEX		Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) 92.1114		SIGNATURE DU PREPOSÉ A LA RECEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI 	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96/15 977

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION :

Composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités importantes de monoxyde d'azote dans l'intestin humain ou animal

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

Société dite : LABORATOIRES STANDA S.A.

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ROUSSEL Edmond, Daniel domicilié 16, rue St Loup 14210 AVENAY

LEGRAND Charles, Gabriel domicilié les Ombrages N° 3 14 Avenue de Creully
14000 CAEN

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

11 Décembre 1996

92.1114

La présente invention concerne une composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités importantes de monoxyde d'azote dans l'intestin humain ou animal.

5 Pendant de nombreuses décennies, on a totalement ignoré que le monoxyde d'azote constitue l'un des éléments nécessaires à la vie et à son maintien ; par suite jusqu'à ces quatre ou cinq dernières années, les chercheurs ne se sont pas penchés sur les bienfaits associés à la présence de cet oxyde,
10 que ce soit en médecine, en nutrition ou en physiologie.

Ce n'est que tout dernièrement que l'on a attribué au monoxyde d'azote un nombre impressionnant de fonctions physiologiques et que l'on a émis l'hypothèse que ce gaz pouvait être impliqué au premier chef dans des fonctions aussi diverses
15 que le contrôle de la pression artérielle, la fonction cytotoxique non spécifique des macrophages, l'agrégation plaquettaire et la neurotransmission ou encore le contrôle de la motricité du tube digestif.

A partir de cette supposition, les recherches portant sur le monoxyde d'azote se sont multipliées et
20 l'importance de ce gaz a pu être confirmée.

Il est connu que le monoxyde d'azote, qui est un gaz très instable (demi-vie inférieure à 5 secondes dans les systèmes biologiques), est produit par biosynthèse au sein de
25 l'organisme humain ou animal à partir de la L-arginine par un groupe d'enzymes dénommées NO-synthases (NOS) dont il existe deux types principaux, à savoir d'une part des NOS constitutives qui sont exprimées notamment dans les cellules endothéliales, les plaquettes sanguines et les neurones et, d'autre part,
30 les NOS inductibles qui sont exprimées principalement par certaines cellules du système immunitaire (macrophages et polynucléaires notamment) par le muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales.

Il est à noter que la production de NO par les NOS
35 inductibles est, de plusieurs ordres de grandeurs, supérieure à la production de NO par les NOS constitutives, mais que dans tous les cas, cette production demeure relativement faible.

Or, et compte tenu du rôle bénéfique susmentionné du monoxyde d'azote, il serait souhaitable de pouvoir augmenter cette production en particulier en utilisant la voie naturelle du métabolisme alimentaire.

5 On n'a cependant jusqu'à présent jamais proposé de moyens permettant de parvenir à ce résultat.

L'objet de l'invention est de combler cette lacune.

Conformément à l'invention, on a pu parvenir au but recherché en constatant que, de manière surprenante, un type
10 particulier de bactéries, les bactéries propioniques, sont susceptibles de produire du monoxyde d'azote, et que parmi ces bactéries, certaines espèces et certaines souches parmi ces espèces en produisent de grandes quantités.

Il s'agit là de bactéries propioniques qui, bien
15 que n'appartenant pas au groupe des bactéries lactiques ou bifidobactéries classiquement introduites dans l'organisme par le biais de desserts lactés ou autres produits laitiers fermentés, sont néanmoins présentes en alimentation humaine depuis des siècles : ce sont en effet elles qui permettent l'obtention des
20 trous lors de la fabrication du fromage dénommé « emmental » qui en fin d'affinage renferme environ 10^9 cellules/g de bactéries propioniques.

Il est à noter que la fermentation de ces bactéries produit entre autre de l'acide propionique, de l'acide acétique
25 et du dioxyde de carbone.

La constatation susmentionnée est d'autant plus surprenante que l'on a pu vérifier que des bactéries lactiques, des bifidobactéries et/ou des levures, utilisées couramment dans le domaine agro-alimentaire, ne produisent pas de monoxyde
30 d'azote.

L'invention se rapporte, en conséquence, à l'utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de dégager des quantités importantes de monoxyde d'azote dans
35 l'intestin humain.

Conformément à l'invention, cette composition peut être constituée par une préparation liquide fermentée ou encore par une préparation déshydratée.

Dans ce dernier cas, elle se présente, avantageusement, sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée quotidiennement.

Ces fractions peuvent être ingérées directement ou
5 être préalablement diluées dans un liquide ; elles peuvent être conditionnées sous une forme permettant de faciliter l'absorption : comprimés, sachets de poudre granulée, liquide, ...

On a vérifié que de telles préparations déshydratées concentrées de bactéries propioniques conservées deux années à +4°C voient leur concentration baisser de moins de un Log.

L'expérience a prouvé que des gélules gastrorésistantes ou non correspondent à un type de conditionnement particulièrement avantageux.

Selon une autre caractéristique de l'invention, chaque fraction individuelle renferme un grand nombre de bactéries, de préférence plus de 10^9 bactéries.

Diverses expérimentations (résumées ci-dessous) ont
20 permis de vérifier indirectement l'aptitude toute particulière des bactéries propioniques à produire du NO à partir de la mesure de l'accumulation d'ions nitrites NO_2^- par différentes souches bactériennes au cours de leur culture.

25 1 - Essais préliminaires comparatifs

Différentes souches bactériennes (inoculum yaourt, bifidobactéries, lactobacillus) ont été cultivées en présence d'un milieu lait reconstitué (100 ml) supplémenté par un extrait de levures (10 g/l) puis incubées à 38°C.

30 L'accumulation de nitrite a été mesurée au cours du temps.

Ces essais préliminaires ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- incubation à 38°C pendant 0, 4, 7 ou 10 heures,
- 35 • 3 répétitions,
- dosage des nitrites par système Bran-Luebbe,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

En raison de la nature des extraits à analyser, une étape de purification des échantillons a été successivement mise en oeuvre par une double centrifugation (2 x 10 min., 4°C, 15 000 rpm), suivie d'une ultrafiltration sur cartouche miniprep 10 (rétention des protéines de PM > 10kD) puis d'une purification partielle par passage de l'échantillon sur résine Waters C18 (55-105 μ m).

Cette méthode a, dans un premier temps, été testée sur des échantillons étalons de nitrite (Figure 1), puis sur des extraits de culture de *Lactobacillus* incubés 7 heures auxquels a été ajoutée ou non une quantité connue de nitrite (Figure 2).

La figure 1 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de bifidobactéries après 10 heures d'incubation,
- (2) d'une solution standard de nitrite,
- (3) de cette même solution ultrafiltrée,
- (4) de cette même solution ultrafiltrée et passée sur résine C18.

La figure 2 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebb :

- (1) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 38°C,
- (2)(3) d'une solution standard contenant 410 μ g de nitrite/l,
- (4)(5) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 38°C auxquels a été ajoutée une quantité connue de nitrite afin d'obtenir une solution à 820 μ g/l de nitrite
- (4) de cette même solution ultrafiltrée et passée sur résine C18.

Ces échantillons ont été purifiés par centrifugation ultrafiltration et passage sur résine C18 dans les conditions décrites précédemment.

Conformément à ces essais, aucune accumulation de nitrite n'a pu être détectée que ce soit à partir d'inoculum de yaourt, de bifidobactéries ou de *Lactobacil-*

lus, ce quel que soit le temps d'incubation (0, 4, 7 ou 10 heures).

2 - Mesures de l'accumulation de nitrite par des cultures de bactéries propioniques - Analyse de l'inhibition de l'enzyme NO synthase

Des cultures de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat pour 100 ml de milieu YEL) ont été mises en contact de différentes concentrations de N-méthyl-L-arginine qui est un inhibiteur connu de l'enzyme NO synthase.

Ces essais ont été mis en oeuvre dans les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
- 5 concentrations d'inhibiteur,
- 3 répétitions pour l'incubation de 24 heures,
- arrêt de l'incubation par ébullition,
- purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,
- dosage des nitrites dans le milieu par analyse sur système Bran-Luebbe.

Dans un premier temps, on a dosé les nitrites accumulés par les bactéries propioniques en l'absence d'inhibiteur afin d'établir une cinétique d'accumulation des nitrites en fonction du temps d'incubation des bactéries sur milieu YEL.

La figure 3 représente, d'une part, les variations de la quantité de nitrite produite (en $\mu\text{g/g}$ de bactéries) en fonction du temps d'incubation (en heures) (\square) et d'autre part les variations de la turbidité (absorbance à $\lambda = 650 \text{ nm}$) également en fonction du temps d'incubation (\circ).

Cette figure montre que la quantité de nitrite est maximale à 24 heures puis diminue ensuite de façon significative après 48 et 72 heures d'incubation.

On peut raisonnablement penser que cette chute résulte de la réduction du nitrite en ammonium par la nitrite réductase à une période où les substrats azotés nécessaires

à la croissance bactérienne sont de moins en moins abondants, comme le prouve la courbe de turbidité.

Ces essais sont bien de nature à prouver que des cultures de bactéries propioniques sur milieu YEL permettent d'obtenir une accumulation de nitrite dans le milieu.

Pour vérifier que cette accumulation de nitrite résulte de la production de NO par voie enzymatique, on a mis en oeuvre des essais similaires pour différents temps d'incubation, et en ajoutant différentes concentrations d'inhibiteur N-méthyl-L-arginine avant chaque incubation.

Les tableaux I, II et III indiquent les effets de différentes concentrations de N-méthyl-L-arginine sur la production de nitrite et la croissance bactérienne (turbidité estimée par absorbante à 650 nm, respectivement pour des durées d'incubation de 24 heures, 48 heures et 72 heures). Dans le cas du tableau I, chaque valeur est la moyenne \pm l'écart type pour les trois mesures.

TABLEAU I

	Incubation 24 heures				
	0	1.10^{-2}	1.10^{-1}	1	3
N-méthyl L arginine en (mM)					6
Nitrite (NO ₂ -) (µg/g bact.)	62 ± 2,6	61 ± 2,9	69 ± 7,6	59 ± 2,8	63 ± 3
Inhibition n % de 0 mM	—	—	—	—	63 %
Turbidité (ABS λ=650nm)	0,84 ± 0,12	0,75 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,79 ± 0,01

TABLEAU II

		Incubation 48 heures		
N-méthyl L arginine en (mM)	0	1.10^{-2}	1.10^{-1}	3
Nitrite (NO ₂ -) (μg/g bact.)	25	24	26	6
Inhibition en % de 0 mM	—	—	—	72 %
Turbidité (ABS λ=650nm)	1,33	1,598	1,40	1,53
				1,38

TABLEAU III

		Incubation 72 heures		
N-méthyl L arginine en (mM)	0	1.10^{-2}	1.10^{-1}	3
Nitrite (NO ₂ -) (μg/g bact.)	38	17	2	3
Inhibition en % de 0 mM	—	55 %	95 %	92 %

Les valeurs de la turbidité prouvent que la croissance bactérienne n'est pas affectée significativement par l'apport d'inhibiteur, quelle que soit la concentration mise en oeuvre et le temps d'incubation.

5 En revanche, l'effet de l'inhibiteur sur l'accumulation de nitrite est évident quel que soit le temps d'incubation. Cependant, pour une concentration donnée, cette inhibition est d'autant plus forte que le temps de culture est élevé : ainsi, l'inhibition la plus élevée
10 est obtenue avec 6 mM de N-méthyl L-arginine pour 24 h de culture (tableau I) et seulement 1 mM et 100 μ M pour 48 h de culture (tableau II) et 72 h de culture (tableau III) respectivement.

On peut expliquer cet effet, en considérant d'une
15 part que l'on est en présence d'une inhibition de type compétitif (l'inhibiteur étant un analogue structural du substrat) et d'autre part que la concentration en substrat diminue progressivement puisqu'utilisée par les bactéries.

En conclusion, ces effets suggèrent fortement que
20 l'accumulation de nitrite observée résulte de l'activité NO synthase, c'est-à-dire de la production de monoxyde d'azote par voie enzymatique.

Compte tenu de ces observations, l'invention se rapporte également à une composition diététique ou médicamenteuse absorbable, caractérisée en ce qu'elle est constituée par
25 une préparation déshydratée renfermant une quantité importante de préférence plus de 10^9 cellules/g, de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur capacité à dégager du monoxyde d'azote à raison d'au moins environ 50 μ g/g de
30 bactéries.

Conformément à l'invention, on a en effet pu prouver que l'accumulation de NO dépend des espèces ou souches de bactéries propioniques mises en oeuvre.

Cette situation a été vérifiée par les essais résumés ci-dessous :
35

3 - Comparaison des accumulations de nitrite dans le milieu de culture dans le cas de 9 souches de 4 espèces différentes de bactéries propioniques

Conformément à cet essai, on a étudié les souches
 5 P20, P23, 2408, 2410, 2500 et 2501 de l'espèce *P.freudenreichii* et les souches TL221, TL223 et TL207 appartenant respectivement aux espèces *P.thoenii*, *P.acidipropionici* et *P.jensenii*.

Il est à noter que les souches TL (technologie lai-
 10 tière) sont des souches appartenant à l'INRA, tandis que la souche P23 a été enregistrée à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le numéro I-1804 en date du 18.12.96.

Les différentes souches de bactéries propioniques
 15 (1 g de lyophilisat ou 5 ml de culture fraîche) ont été cultivées sur 100 ml de milieu YEL selon les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 12, 24, 36 ou 48 heures,
- 3 répétitions,
- 20 • arrêt de l'incubation par ébullition,
- purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,
- accumulation de nitrite dans le milieu, mesurée par analyse sur système Bran-Luebbe,
- 25 • estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Les résultats obtenus pour chaque souche sont rassemblés sur la figure 4.

Celle-ci représente, dans chaque cas, les varia-
 30 tions de l'accumulation de nitrite (\square) et de la turbidité du milieu de culture (O) en fonction de la durée d'incubation. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm l'écart type de la moyenne pour $n = 3$.

Il convient de noter que les échelles
 35 d'accumulation du nitrite sont 25 fois plus grandes dans le cas des souches P23 et TL223.

Ces résultats prouvent que la croissance bactérienne, estimée d'après l'évolution de la turbidité du mi-

lieu de culture, est proche pour l'ensemble des souches étudiées, atteignant environ 2 à 2,5 DO après 48 heures d'incubation, à l'exception de la souche TL221 pour laquelle la turbidité n'atteint que 0,6 DO après 2 jours.

5 En revanche, il existe des différences hautement significatives quant à l'accumulation de nitrite en fonction du temps.

En effet, les souches 2500, 2408, P20, 2501, 2410, TL207 et TL221 accumulent une quantité relativement peu im-
10 portante de nitrite, le maximum ($0,1 \mu\text{g}$ de NO_2^-/ml) étant atteint respectivement après 36, 12, 36, 12, 12, 24 et 24 heures d'incubation.

A l'opposé, une accumulation beaucoup plus forte de nitrite a été obtenue avec des souches P23 et TL223 qui ac-
15 cumulent, au maximum, $1,8 \mu\text{g}$ de NO_2^-/ml après, respectivement, 36 et 24 heures d'incubation.

Il est à noter que la souche de bactéries propioniques analysée dans le second essai susmentionné (figure 3 ; tableaux I, II et III) avait une position intermédiaire avec une accumulation maximale de NO_2^- , d'environ
20 $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Ces essais ont donc permis de constater qu'il existe des différences significatives entre les quantités de nitrite pouvant être produites par différentes souches
25 de bactéries propioniques de quatre espèces différentes, ces différences étant indépendantes de la croissance de ces souches.

Ces résultats ont pu être confirmés par l'étude pour chaque souche de l'évolution de la concentration en nitrite du milieu de culture en fonction de sa turbidité et
30 donc approximativement de la croissance bactérienne.

Les résultats de ces derniers essais sont rapportés sur la figure 5 sur laquelle chaque valeur correspond à la moyenne \pm l'écart type de la moyenne pour $n = 3$.

35 Compte tenu de ces résultats, l'invention se rapporte également à une composition diététique ou médicamenteuse absorbable du type susmentionné, caractérisée en ce

qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la souche P23 de l'espèce *P. freudenreichii*.

L'invention concerne également une composition diététique ou médicamenteuse absorbable de ce type, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la souche TL223 de l'espèce *P. acidipropionici*.

Les essais susmentionnés ont été de nature à établir que, parmi les souches étudiées, la souche TL223 est la plus fortement accumulatrice de nitrite. Cette souche a donc été retenue dans le cadre d'un essai complémentaire portant sur la mesure directe de la production de monoxyde d'azote.

4 - Mesure de la production de NO par la souche TL223 sous atmosphère d'hélium

Conformément à ces essais, les cultures ont été réalisées dans des tubes de 10 ml contenant 5 ml de milieu YEL et 0,25 ml de culture fraîche de la souche TL223.

L'atmosphère des tubes a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (100 ml/min.) pendant 100 secondes.

L'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes a ensuite été mesurée au cours du temps dans les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
- 4 répétitions,
- mesure de l'accumulation de NO par analyse en spectrométrie de masse,
- estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Lors d'un essai préliminaire, le système purification de gaz (Roboprep G+) - spectromètre de masse (Twenty-Twenty) a été calibré par des quantités croissantes de monoxyde d'azote.

Ce gaz a été généré à partir de NaNO_2 en présence d'une solution de KI et H_2SO_4 .

L'identification et la quantification du monoxyde d'azote ont été réalisées par sa masse : 30 pour $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ et

31 pour $^{15}_{16}\text{N}$ O et $^{14}_{17}\text{N}$ O. Cette identification a ensuite été confirmée par la mesure du rapport isotopique : $31/30 = [^{15}_{16}\text{N} \text{ O} + ^{14}_{17}\text{N} \text{ O}] / ^{14}_{16}\text{N} \text{ O}$. Il est à noter que le rapport isotopique théorique 31/30 du NO est de 0,00367 en l'absence de contamination par ^{17}O .

Les résultats de cet essai préliminaire sont rapportés sur la figure 6 sur laquelle la partie gauche (A) correspond à la courbe d'étalonnage du spectromètre de masse utilisé pour la quantification du monoxyde d'azote tandis que la partie droite (B) correspond à la mesure du rapport isotopique 31/30.

Les résultats proprement dits de cet essai sont rapportés sur la figure 7.

Plus précisément, la figure 7A représente les variations de l'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes en fonction de la turbidité du milieu tandis que la figure 7B représente les variations de cette accumulation en fonction du temps d'incubation.

Les barres verticales ou horizontales indiquent, lorsqu'elles sont plus larges que le symbole, l'écart type de la moyenne pour $n = 4$.

Une comparaison de la figure 7B (qui représente l'évolution au cours du temps de la turbidité du milieu de culture sous hélium) avec la figure 4 (qui représente cette même évolution à l'air) montre que la croissance de la souche TL223 n'est pas affectée significativement par une atmosphère constituée essentiellement d'hélium.

On a également pu établir que la vitesse d'accumulation du monoxyde d'azote dans l'atmosphère est constante durant environ les 45 premières heures d'incubation, puis s'infléchit ensuite (figure 7B), ce qui correspond à une turbidité proche de 1,5 DO (figure 7A).

Après environ 65 heures d'incubation (turbidité supérieure à 1,7 DO), environ 1,5 μg de NO sont accumulés dans l'atmosphère d'hélium pour 1 ml du milieu de culture.

On peut supposer que ce chiffre et les dosages de NO pourraient être légèrement sous-estimés en raison d'une contamination faible mais constant par l'oxygène de l'air

lors de l'analyse en spectrométrie de masse (oxydation du monoxyde d'azote en nitrite).

L'ordre de grandeur obtenu est néanmoins compatible avec les teneurs en nitrite mesurées dans le milieu pour des cultures au contact de l'air (essai n° 2).

Dans ce dernier cas, on avait en effet pu constater (figure 5) que la souche TL223 accumulait au maximum 1,8 mg de NO_2^- /ml pour une turbidité de 1,5 DO, ce qui correspond à environ 1,2 μg de NO /ml.

Ces résultats semblent prouver que la procédure utilisée (atmosphère d'hélium) ne bloque pas totalement la transformation du NO en nitrite au sein du milieu. On aurait, en effet, pu s'attendre à ce que la quantité de NO retrouvée dans l'atmosphère d'hélium (phénomène cumulatif) soit très largement supérieure à la quantité de nitrite accumulée dans le milieu (phénomène transitoire).

Néanmoins, les valeurs obtenues pour le dégagement de monoxyde d'azote en atmosphère aérobie doivent être considérées comme significatives.

Il est à noter que, conformément à une autre caractéristique de l'invention, il peut être avantageux d'ajouter un supplément d'arginine ou d'un produit riche en arginine à la composition conforme à l'invention.

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition peut également renfermer d'autres bactéries telles que des bifidobactéries et/ou des bactéries lactiques.

Les avantages associés à l'ingestion de bactéries propioniques ont, en outre, été vérifiés par des investigations réalisées in vivo chez l'homme sain.

5 - Etude de l'effet de l'ingestion de bactéries propioniques sur le transit intestinal chez l'homme sain

Cette étude a été réalisée en milieu hospitalier au CHU de Caen sur une série de 19 sujets masculins volontaires sains.

Au début de ce test, on a fait absorber quotidiennement à chaque volontaire 10 marqueurs radio opaques, ce pendant 8 jours consécutifs, conformément au protocole dé-

crit dans les publications Arhan P, Devroede G, Jehannin B et coll. *Dis Colon Rectum* 1981 ; 24:625-9. et Bouchoucha M, Devroede G. Arhan P et coll. *Dis Colon Rectum* 1992 ; 35:773-82.

5 Selon ce protocole, l'étude du transit est effectuée par comptage des marqueurs radio opaques ingérés dans les différentes aires de la cavité abdominale répartis sur un cliché d'abdomen de face. Ces aires (côlon droit, côlon gauche et rectosigmoïde) sont définies par des lignes fictives joignant la 5^{ème} vertèbre lombaire au contour de la
10 cavité pelvienne. Le temps de transit est calculé selon la formule $T = 1/N \cdot n \cdot \Delta t$; N étant égal à 10 marqueurs, n représentant le nombre de marqueurs comptés dans une région et Δt étant égal à 24 heures.

15 Le jour suivant cette ingestion, c'est-à-dire le 9^{ème} jour, on a fait subir aux volontaires une radiographie de l'abdomen de face sans préparation.

 A partir du jour suivant, c'est-à-dire du 10^{ème} jour, on a fait ingérer quotidiennement à chaque volontaire, ce pendant 2 semaines, une gélule contenant
20 5 10^{10} bactéries propioniques issues d'une banque de souches utilisées dans l'industrie fromagère, donc parfaitement inoffensives pour l'homme.

 Une seconde étude du temps de transit similaire à
25 la première a été effectuée durant la seconde semaine d'ingestion des propioniques, c'est-à-dire du 17^{ème} au 26^{ème} jour.

 Cette étude a révélé un ralentissement significatif du temps de transit du côlon gauche ($p < 0,05$ conformément
30 au test statistique Wilcoxon Matched-Paired Signed-Ranks Test.) ; les temps de transit du colon droit et du rectosigmoïde n'ont pas été significativement modifiés par l'ingestion des propioniques.

 Cette étude a donc permis de prouver que l'ingestion
35 de bactéries propioniques a une influence sur la motricité intestinale ; on peut supposer que ces résultats sont liés à la synthèse de monoxyde d'azote par les bactéries propioniques.

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de dégager des quantités importantes de monoxyde d'azote dans l'intestin humain.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition diététique ou médicamenteuse absorbable est constituée par une préparation déshydratée.

3°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la composition se présente sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée quotidiennement.

4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que chaque fraction individuelle renferme plus de 10^9 bactéries.

5°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition diététique ou médicamenteuse absorbable est constituée par une préparation liquide fermentée.

6°) Composition diététique ou médicamenteuse absorbable, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une préparation déshydratée renfermant une quantité importante de préférence plus de 10^9 cellules/g de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur capacité à dégager du monoxyde d'azote à raison d'au moins au moins 50 $\mu\text{g/g}$ de bactéries.

7°) Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la souche TL223 de l'espèce *P.acidipropionici*.

8°) Composition selon la revendication 6,
caractérisée en ce qu'

elle renferme des bactéries propioniques appartenant à la sou-
che P23 de l'espèce *P. freudenreichii*.

5

9°) Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à
8,

caractérisée en ce qu'

10 elle renferme en outre un supplément d'arginine ou d'un produit
riche en arginine.

10°) Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à
9,

caractérisée en ce qu'

15 elle renferme en outre d'autres bactéries telles que des bifi-
dobactéries et/ou des bactéries lactiques

1/5

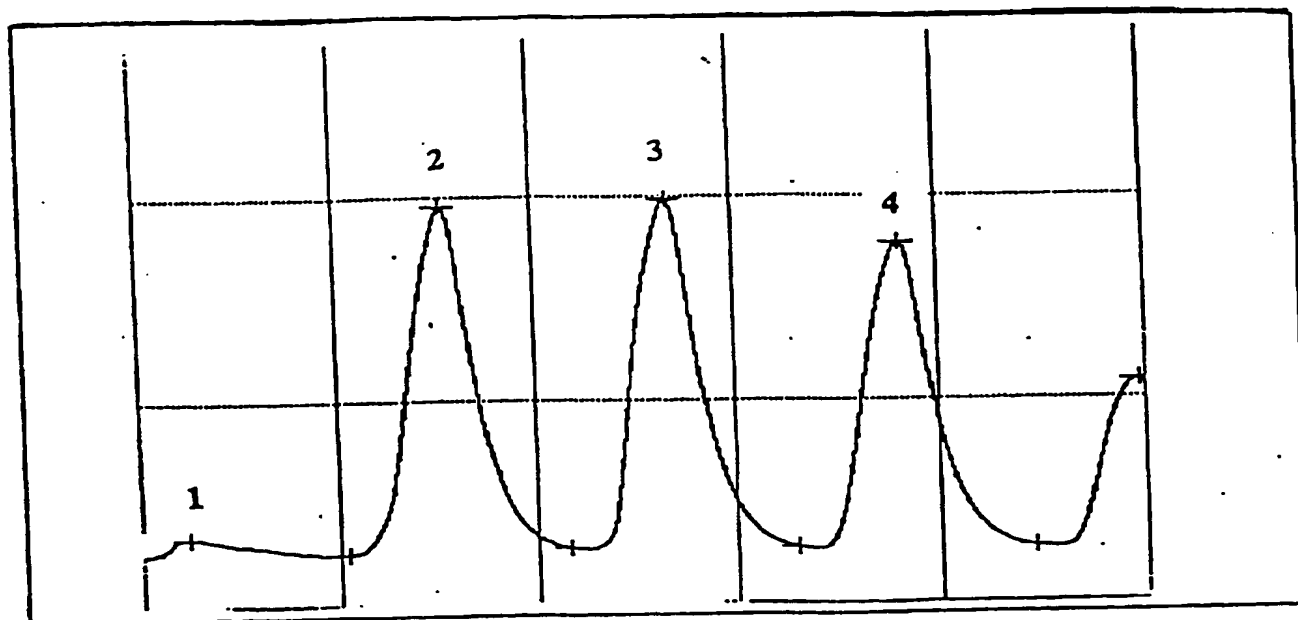


Figure 1

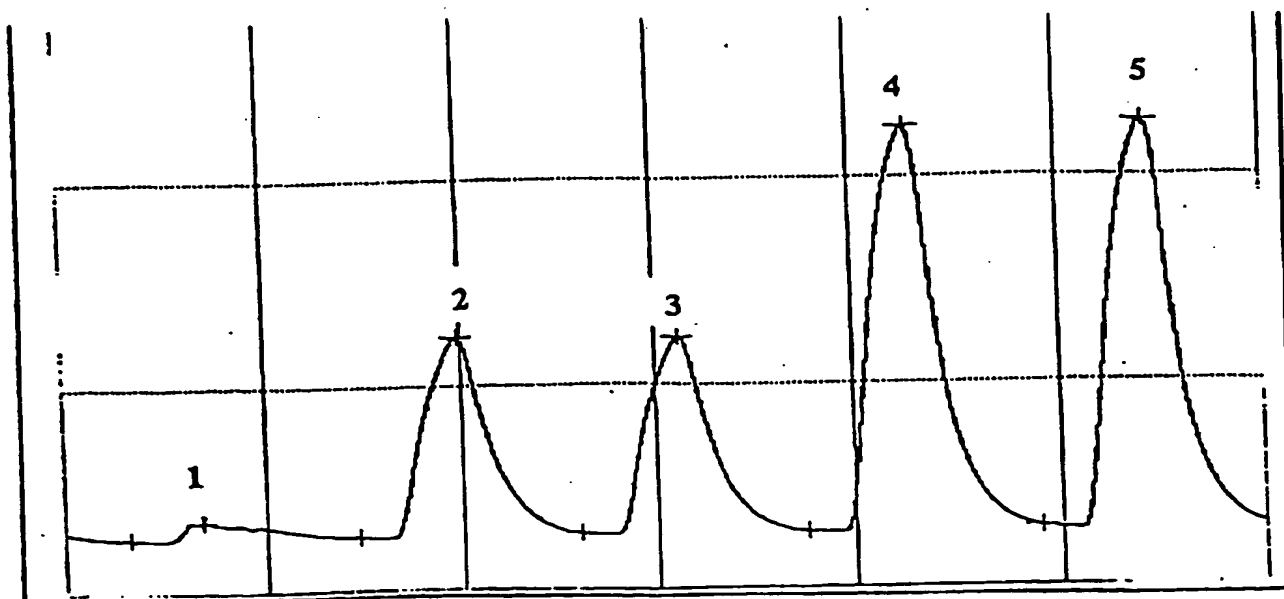


Figure 2

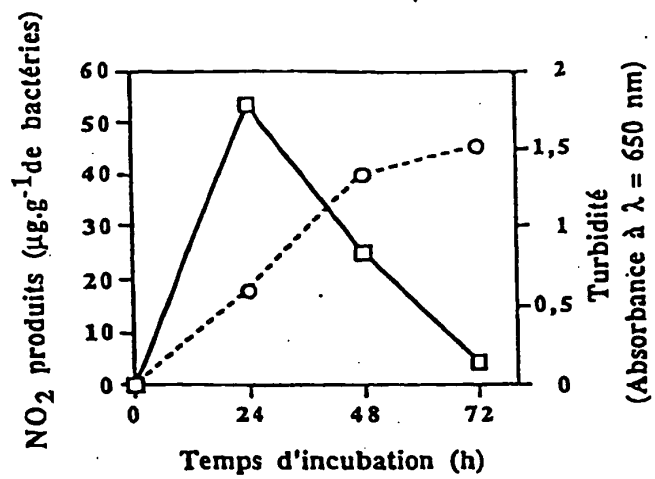


Figure 3

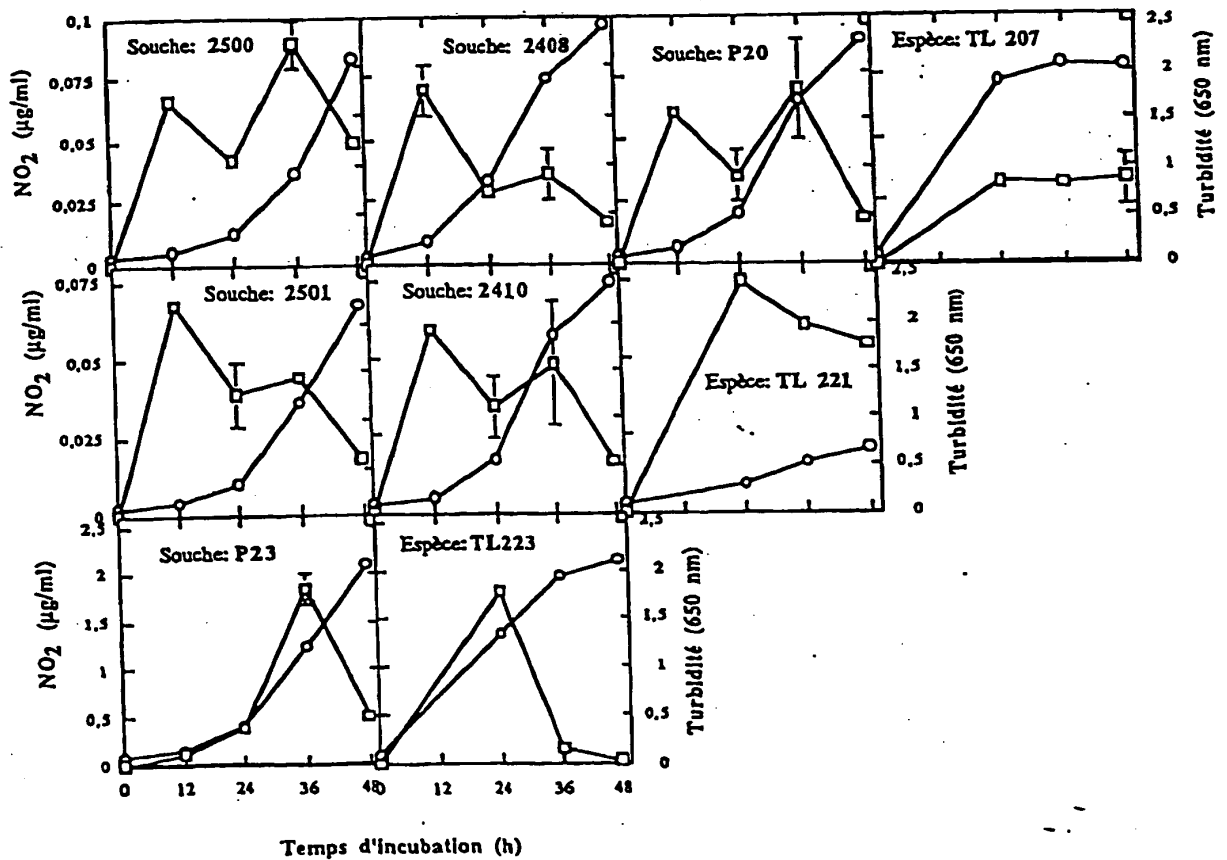


Figure 4

3/5

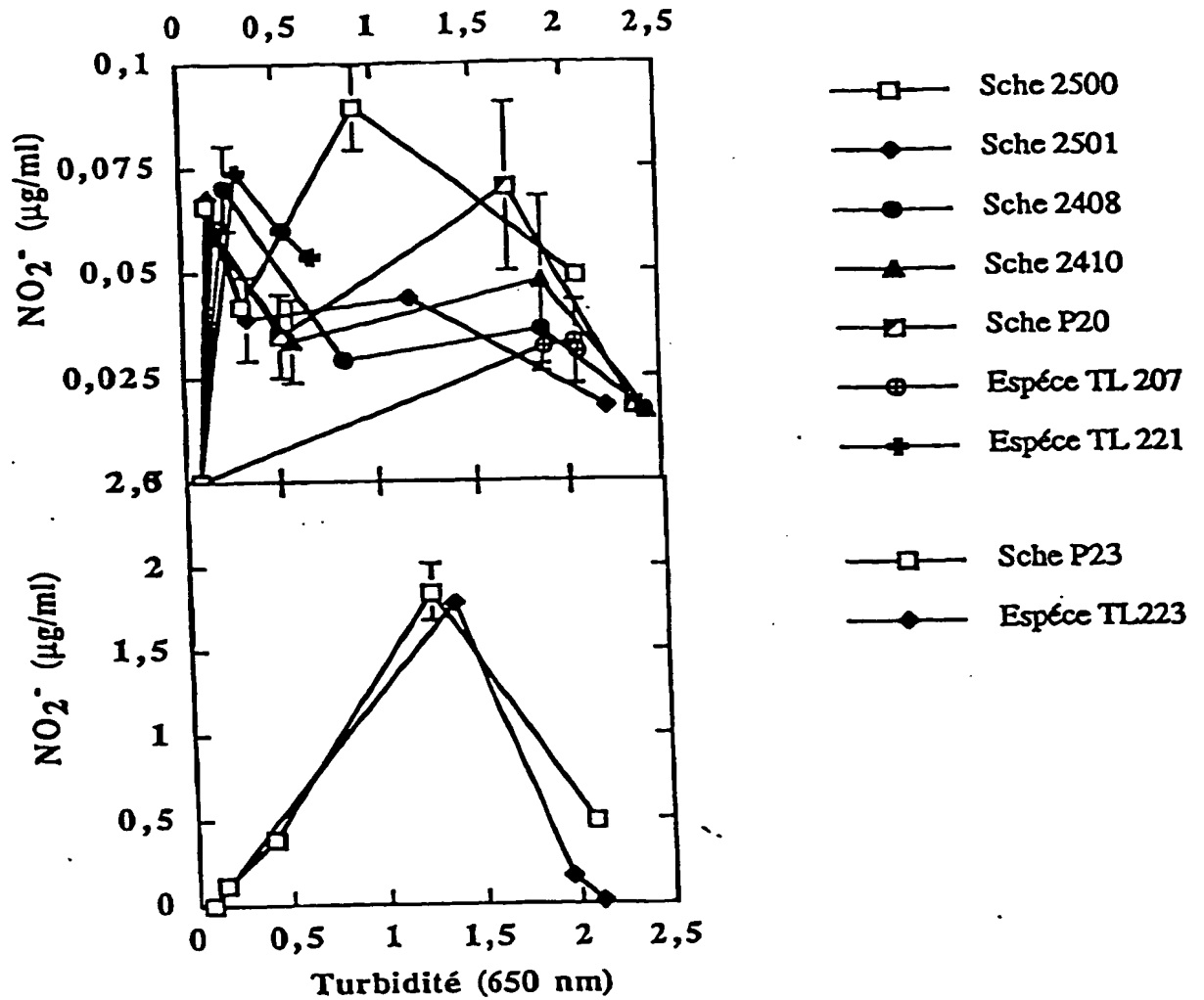


Figure 5

4/5

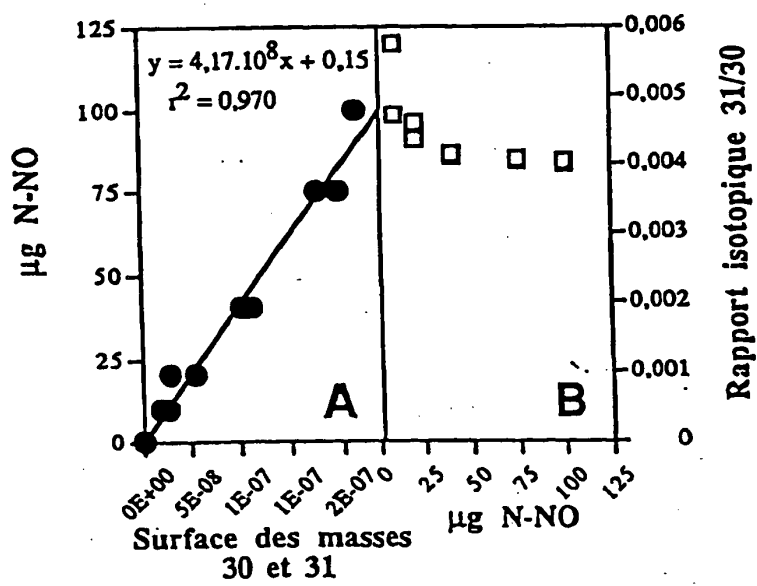


Figure 6

5/5

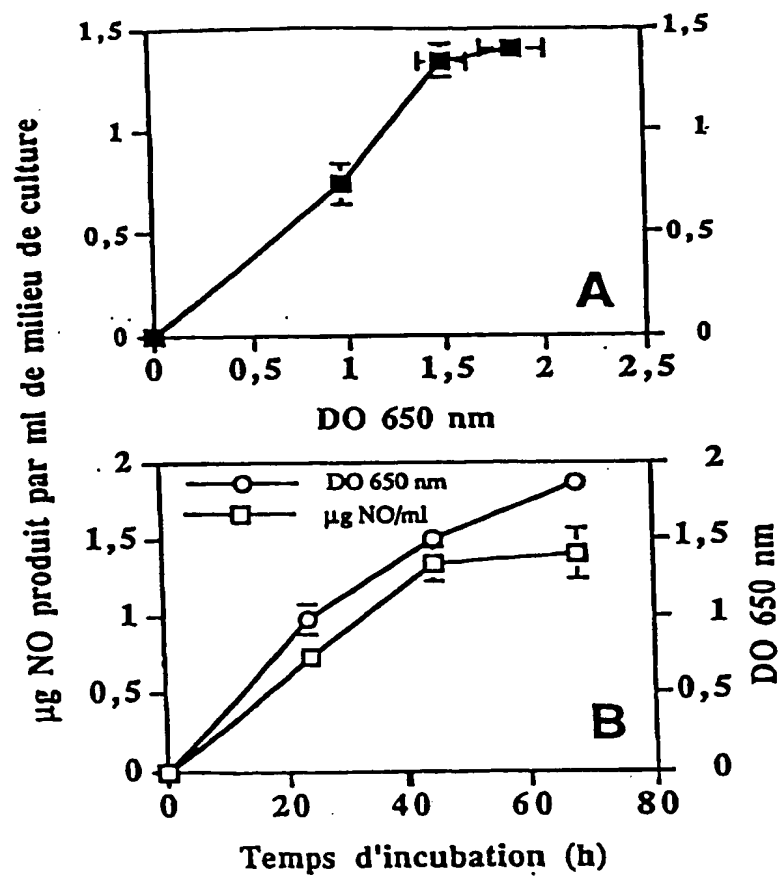


Figure 7